

Aus der Hämatologischen Abteilung im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. med. H. Brücher

UNTERSUCHUNGEN ZUR STIMULATION MENSCHLICHER
PERIPHERER LYMPHOZYTENKULTUREN DURCH Zn^{++}

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Giso Autheried

Berlin

1971

Aus der Hämatologischen Abteilung im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin

Leiter: Prof. Dr. med. H. Brücher

Untersuchungen zur Stimulation menschlicher
peripherer Lymphozytenkulturen durch Zn^{++}

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von:

Giso Autheried

Berlin

Referent: Prof. Dr. med. H. Brücher

Korreferent: Prof. Dr. med. Walther Pribilla



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 3. September 1971

Inhaltsverzeichnis

Seite

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	5
21	Kulturansatz	5
22	Kulturmedium	6
23	Plasma und Plasmaersatzstoffe	6
24	Inkubation	6
25	Stimulans	7
26	Szintillationszählung	7
27	Trypanblaumethode	8
3	Versuche und Ergebnisse	11
31	Allgemeine Kulturvariable	11
311	Typ der Sedimentation	11
312	Kulturgefäße	12
313	Kulturmedien	13
314	Zellzahl	14
315	Plasma - Serum	15
316	Verhältnis Plasma - Zinkkonzentration	16
32	Variabilität der Zn^{++} -Stimulation von Lymphozytenkulturen	18
321	Variabilität bei einem größeren Spenderkollektiv	18
322	Individuelle Variabilität	18
33	Ursachen der Variabilität	21
331	"Reine" Lymphozytenpopulationen	21

	Seite
332 Prozensatz Lymphozyten im Kulturansatz	21
333 Plasmaersatzstoffe	22
334 Fetales Kalbsserum (FKS) als Plasma- ersatz	24
335 AB-Plasma statt autologem Plasma	24
4 Diskussion	27
5 Zusammenfassung	35
6 Literaturverzeichnis	37

1 Einleitung

Lymphozyten spielen bei vielen immunologischen Prozessen eine entscheidende Rolle, u.a. bei der Allergie vom verzögerten Typ, bei der sog. graft versus host reaction und bei der Transplantatabstoßung (12, 16), sowie vermutlich bei der Abwehr neoplastischen Wachstums (32). Bis vor kurzem galten die peripheren Lymphozyten als Endformen, die weder in vivo, noch in vitro zu einer Proliferation fähig seien (68). Im Jahre 1960 zeigte jedoch NOWELL (41), daß das aus der roten Nierenbohne gewonnene Phytohämagglutinin (PHA) neben der seit langem bekannten Hämagglutination (8) auch eine sogenannte Lymphozytentransformation hervorruft. Dabei wandeln sich die Lymphozyten in vitro in blastenartige Zellen um, die sich dann mitotisch teilen. Während dieser Entwicklung treten bei ihnen charakteristische morphologische Veränderungen auf (61, 62, 69). Zellen und Zellkerne vergrößern sich auf das zwei- bis dreifache ihres ursprünglichen Durchmessers. Die Kerne weisen ein aufgelockertes Chromatingerüst und meist ein bis mehrere Nukleoli auf. Das Plasma ist ausgesprochen basophil und enthält Vakuolen und eine perinukleäre Aufhellungszone. Weiterhin lassen sich in den stimulierten Kulturen eine Reihe von Stoffwechselveränderungen nachweisen (ausführliche Übersichten bei 33 und 40). Bemerkenswerterweise kommt es schon kurz nach Zugabe des PHA zu einer Veränderung der Desoxyribonukleoproteine (27), einer Acetylierung von

Histonen (50) und einer Zunahme der Phospholipidsynthese (26). Die in unbehandelten Kulturen geringfügige Protein- und Ribonukleinsäuresynthese steigt nach Zugabe des Stimulans während der ersten 48 Stunden stetig an (15, 36, 37). Die Induktion von Desoxyribonukleinsäure (DNA) beginnt etwa 20 Stunden nach Kulturbeginn (38). Zusätzlich sind in den stimulierten Kulturen Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel (18) und im Gehalt lysosomaler Enzyme (21) beschrieben worden.

Die Auswertung stimulierter Lymphozytenkulturen kann entweder nach morphologischen Kriterien (Prozentsatz Blasten, Mitosenindex, Autoradiographie) oder durch Stoffwechselmessungen erfolgen. Dabei ist die Messung des Einbaues von Tritium-Thymidin (TdR^3H) als Parameter der DNA-Synthese besonders geeignet. Dieses Verfahren ist den semi-quantitativen morphologischen Methoden gerade bei der Durchführung größerer Versuchsserien überlegen und wird in der vorliegenden Arbeit durchweg angewendet.

Inzwischen wurden außer dem PHA noch eine Reihe weiterer Stoffe gefunden, die in der Lage sind, Lymphozytenkulturen zu stimulieren. Sie lassen sich in folgende Gruppen einteilen:

- a) Phytomitogene (5, 6, 52)
- b) Spezifische Antigene nach vorheriger Sensibilisierung (14, 42, 47)
- c) "Mixed culture reaction", d.h. Stimulation durch die Zellen eines zweiten Spenders (4)

d) verschiedene bakterielle Produkte (23, 34)

e) Antiseren (17, 44)

Bei der Untersuchung einer größeren Anzahl von Metallsalzen (31) wurde gefunden, daß neben der bereits bekannten stimulierenden Wirkung von Quecksilberverbindungen (11, 60) auch Zinksalze eine Stimulation von Lymphozytenkulturen bewirken (30, 58).

Zink stellt im Gegensatz zu Quecksilber ein physiologisch wichtiges Metall dar, von dem auch im menschlichen Körper relativ große Mengen (2 - 4 g) vorhanden sind. Zn^{++} ist für die Funktion vieler Enzyme notwendig, ansonsten ist es jedoch betreffs seiner biologischen Wirkungsweise weitgehend unerforscht (Übersicht bei 53). Vermutlich spielt es eine bedeutende Rolle im DNA-Stoffwechsel, wie die Befunde in verschiedenen experimentellen Versuchsmodellen vermuten lassen (1, 65, 66). Ein fördernder Effekt oral gegebenen Zinksulfates auf die Wundheilung ist kürzlich beschrieben worden (51).

Bei den weiter oben angeführten Stimulantien (Antigene, Phytomitogene usw.) handelt es sich ausschließlich um Makromoleküle unbekannter Zusammensetzung. Die Metallionen Hg^{++} und Zn^{++} haben ihnen gegenüber den Vorteil der einfachen Struktur. Sie sind deshalb besonders geeignet, weitere Untersuchungen im System der Lymphozytenkultur durchzuführen. Derartige Untersuchungen sind erwünscht,

da der Wirkungsmodus der Lymphozytentransformation noch weitgehend unbekannt ist. Es ist denkbar, daß dann Befunde aus dem Modell der Metallionen-stimulierten Kultur auf andere Stimulationsmechanismen übertragen werden können.

Die Bedeutung von Kulturbedingungen für die Stimulation von Lymphozytenkulturen sind im Falle des PHA mehrfach eingehend untersucht worden (24, 39, 49, 59, 67). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die optimalen Kulturbedingungen für die neuentdeckte Stimulation der Lymphozytenkulturen durch Zn^{++} zu definieren.

2 Material und Methoden

2.1 Kulturansatz

Heparinisiertes Blut gesunder Versuchspersonen (10 IE/ml, Liquemin-Roche) wurde im Verhältnis 1:10 mit 6 %igem Dextran vermischt (Macrodex-Knoll). Nach 60minütiger Sedimentation (37°C) wurde der leukozytenreiche Überstand entfernt und dann durch Zentrifugation (1000 g, 10 min) zusätzliches Plasma gewonnen. Von dem leukozytenreichen Überstand wurde mit einem elektronischen Partikelzählgerät (Coulter Counter, Modell F) nach einer Standardmethode die Zellzahl bestimmt. Es fanden sich $8 - 12 \times 10^6$ weiße Blutzellen pro ml, sowie 2 - 4 Erythrozyten pro Leukozyt. In einem Teil der Versuche wurde der leukozytenreiche Überstand mit zusätzlichem Plasma und Kulturmedium so gemischt, daß eine Zellzahl von $1,0 \times 10^6$ /ml und 30 % autologes Plasma resultierten. In anderen Versuchen wurde der Überstand bei 200 g 10 min lang zentrifugiert. Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen (Hanks'sche Lösung) in Medium aufgenommen, das mit Plasma oder dem entsprechenden Analogon versetzt war. Vom Kulturansatz wurden Ausstriche angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Bei der Auszählung von 1000 Zellen je Präparat lag der Prozentsatz Lymphozyten zwischen 28 und 73 %. 95 bis 99 % "reine" Lymphozytenpopulationen wurden nach der Methode von Brandt et al. (10) gewonnen, wobei das heparinisierte Vollblut durch eine mit Nylonwatte (Leukopak-Fenwal) gestopfte

Glasmantelsäule gefiltert und dann wie oben weiter behandelt wurde.

22 Kulturmedium

Das Kulturmedium bestand in der Mehrzahl der Versuche aus Minimal Essential Medium Eagle (MEM, Flow Lab.). In einer vergleichenden Versuchsserie wurden folgende Medien in ihrer Wirkungsweise auf die Zn^{++} -Stimulation miteinander verglichen: MEM, Basal Medium Eagle, Ham's F 10, L 15 - Leibowitz, Scherers Medium (Flow Lab.), sowie MEM Spinner modified, TC 109 und TC 199 (Difco). Sie wurden, falls notwendig, mit Glutamin (2 mM, Flow Lab.) ergänzt. Antibiotika wurden nicht verwendet.

23 Plasma und Plasmaersatzstoffe

In der Regel wurde bei den Experimenten 30 % autologes Plasma verwendet. In verschiedenen Versuchsreihen wurde dieses ersetzt durch autologes Serum, frisches AB-Plasma und fetales Kalbsserum (Flow Lab.). In weiteren Experimenten wurde autologes Plasma substituiert durch 20 %ige Humanalbuminlösung (Behringwerke), Humanserum-Ultrafiltrat (Difco), 6 %iges Dextran (Macrodex-Knoll) und 5 %ige Glukoselösung (Braun-Melsungen).

24 Inkubation

Nach unbefriedigenden Versuchen mit einer ganzen Anzahl verschiedener Kulturgefäße erwiesen sich schließlich Einmal-

Plastik-Kulturröhrchen (16 x 125 mm, Falcon) und Glas-kulturröhrchen (16 x 120 mm, Flow) als geeignet. Die Röhrchen mit 3 ml Kulturflüssigkeit wurden mit ihren Originalschraubkappen leicht bedeckt und bei 37°C in einem mit Luft und 5 % CO₂ begasten Brutschrank 6 Tage lang inkubiert. Die Kulturgefäße befanden sich während der Inkubation in aufrechter Position und wurden nicht bewegt.

25 Stimulans

Als Stimulans wurde in dieser Arbeit nur ZnCl₂ (pro analysi, Merck) benutzt. Es wurde in 9,5 Teilen 0,9 %iger NaCl und 0,5 Teilen 0,1 N HCl gelöst und durch Filtration sterilisiert (Millipore-Filter). Soweit nicht anders angegeben, wurden in jedem Versuch drei Zinkkonzentrationen (2,5 ; 3,0 und 3,5 x 10⁻⁴ M) im optimalen Bereich (58) untersucht und davon der höchste Stimulationswert angegeben.

26 Szintillationszählung

Als Parameter der Stimulation diente die Messung des Gesamteinbaues von ³H-Thymidin (TdR³H) in die säureunlösliche Fraktion. Dazu erhielten Dreifachkulturen während der letzten vier Stunden der Inkubation je 2 µCi TdR³H (spezifische Aktivität 2 Ci/mM - Radiochemical Centre Amersham) und wurden anschließend in ein Eisbad gestellt. Sie wurden dann nacheinander in 4 ml gekühlter 0,9 %iger Kochsalzlösung

(zweimal), in 2 ml gekühlter 5 %iger Trichloressigsäurelösung (zweimal) und in 2 ml gekühltem absoluten Äthylalkohol (einmal) gewaschen (Zentrifugation 10 min bei 4°C und 1000 g). Das letzte Sediment konnte während 45 min bei 60°C in Hyamine (Packard) gelöst werden. Der Inhalt jedes Kulturröhrchens wurde mit 3 x 5 ml Szintillationsflüssigkeit (100 g Naphthalin (Merck), 7 g PPO (Merck), 0,3 g POPOP (Packard) auf 950 ml Dioxan) in Probengläschen überführt. Diese wurden in einem Tricarb-Szintillationspektrometer Modell 3380 (Packard) dreimal 5 min unter Verwendung eines automatischen externen Standards gemessen. Die Ergebnisse werden als mittlere Impulszahl/Kultur/min (cpm) von Dreifachkulturen angegeben. Der Quench-Effekt war wegen der stets gleichen Versuchsbedingungen immer konstant (30 % Zählverluste). Deshalb wurde die Aktivität nicht von cpm in dpm umgerechnet. Bei den aus Dreifachkulturen berechneten Mittelwerten betrug die Abweichung der Einzelwerte durchschnittlich ± 10 %. Überschritt sie 15 %, wurden die Ergebnisse verworfen. In den meisten Experimenten wurde ein Stimulationsindex nach folgender Formel errechnet:

$$SI = \frac{\text{mittlere Impulszahl/Kultur/min in Zn}^{++} \text{ - Kulturen}}{\text{mittlere Impulszahl/Kultur/min in Kontrollkulturen}}$$

27 Trypanblaumethode

Vitalitätsuntersuchungen wurden nach der von Turk et al. (63) angegebenen Modifikation des Trypanblautestes durch-

geführt. Dabei wurden die Zellen 15 min bei 37°C in einer 0,1 %igen Trypanblaulösung (Chroma) inkubiert und dann in einer Zählkammer der Prozentsatz blau gefärbter Zellen bestimmt.

In der Arbeit verwendete Abkürzungen

cpm	Impulszahl/Kultur/min
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FKS	Fetales Kalbsserum
MEM	Minimal Essential Medium Eagle
PHA	Phytohämagglutinin
SI	Stimulationsindex
TdR ³ H	Tritium - Thymidin

3 Versuche und Ergebnisse

31 Allgemeine Kulturvariable

Als Voraussetzung für die späteren Versuchsserien mußte in den ersten Experimenten der Einfluß einiger wesentlicher Kulturvariablen überprüft werden. Die dabei ermittelten optimalen Kulturbedingungen wurden dann in allen weiteren Versuchen konstant gehalten.

311 Typ der Sedimentation

Da sich das Blut bei vielen gesunden Versuchspersonen auch nach längerer Sedimentation nicht ausreichend absetzt, ist die Ausbeute an leukozytenreichem Überstand dann entsprechend gering. Durch Zusatz von Dextran kann die Senkungsgeschwindigkeit soweit erhöht werden, daß die Menge des Überstandes in dem für größere Versuche erforderlichen Ausmaß zunimmt. In Parallelansätzen wurde das Blut teils mit und teils ohne Zusatz von Dextran sedimentiert und in den gewonnenen Lymphozytenkulturen die DNA-Synthese 144 h nach ZnCl_2 -Gabe gemessen. Dabei zeigte es sich, daß Dextran keinen wesentlichen Einfluß auf die Zinkstimulation der Lymphozyten ausübt (Tab. I) und deshalb zur Verbesserung der Sedimentation unbedenklich verwendet werden kann.

Tab. I

Die Beeinflussung der Zn^{++} -Stimulation menschlicher peripherer Lymphozyten durch 6 %iges Dextran

ZnCl ₂ -Konzentration	Spontansedimentation		Dextran-Sedimentation	
	Zn*	SI**	Zn*	SI**
Kein Zusatz	1 867	--	1 676	--
2,5 x 10 ⁻⁴ M	84 136	45	89 045	53
3,0 x 10 ⁻⁴ M	83 136	45	60 602	36
3,5 x 10 ⁻⁴ M	46 904	25	47 692	28

* TdR³H-Aufnahme (mittlere cpm aus Dreifachansätzen)

** Stimulationsindex (Verhältnis der mittleren cpm Zn^{++} -behandelter Kulturen zu den mittleren cpm unbehandelter Kontrollkulturen)

312 Kulturgefäße

Ein weiterer entscheidender Punkt ist die Auswahl der Kulturgefäße. Bei der Überprüfung einer großen Anzahl in Form und Material unterschiedlicher Kulturgefäße hatten sich schließlich zwei Arten von Kulturröhrchen als geeignet erwiesen, nämlich 16 x 125 mm Plastikröhrchen und 16 x 120 mm Glasröhrchen, die sich in mehreren vergleichenden Untersuchungen nicht wesentlich voneinander unterschieden (Tab. II). Wegen des Vorteils der einmaligen Verwendung wurden später nur noch Plastikröhrchen verwendet.

Tab. II

Zn^{++} -Stimulation menschlicher peripherer Lymphozyten in Kulturröhrchen aus Plastik und Glas

ZnCl ₂ -Konzentration	Plastikgefäße		Glasgefäße	
	Zn*	SI	Zn*	SI
Kein Zusatz	2 290	--	2 076	--
$2,5 \times 10^{-4}$ M	140 667	61	120 747	50
$3,0 \times 10^{-4}$ M	147 056	64	103 870	50
$3,5 \times 10^{-4}$ M	141 980	62	128 709	62

* TdR³H-Aufnahme (mittlere cpm) wurde aus Dreifachansätzen ermittelt.

313 Kulturmedien

Die Bedeutung der Zusammensetzung des Kulturmediums für die Zn^{++} -Stimulation menschlicher Lymphozyten konnte in einer Serie von Experimenten gezeigt werden. Dabei wurden Minimal Essential Medium Eagles (MEM), die nach Spinner modifizierte Form dieses Mediums, Basal Medium Eagle, Ham's F 10, L 15 Leibowitz, Scherers Medium, TC 109 und TC 199 geprüft. Mit MEM konnten stets die höchsten Stimulationswerte erzielt werden. Scherers Medium und L 15 erwiesen sich als ungeeignet, während die Werte für die übrigen Medien von Experiment zu Experiment unterschiedlich ausfielen. Die Ergebnisse eines typischen Versuches sind in Tab. III dargestellt. In den folgenden Versuchen wird stets MEM verwendet.

Tab. III

Der Einfluß verschiedener Kulturmedien auf die Zn^{++} -Stimulation menschlicher peripherer Lymphozyten

Medium**	Zn*	Kontrollen*	SI
MEM	140 775	1 077	131
Ham F 10	103 703	999	104
BME	33 009	650	51
MEM S	49 675	1 171	42
TC 109	79 044	861	41
TC 199	15 130	861	17
Scherer's	7 800	1 286	6
L 15	999	662	1

* TdR³H-Aufnahme (mittlere cpm aus Dreifachansätzen)

** MEM (Minimal Essential Medium), BME (Basal Medium Eagle), MEM S (Minimal Essential Medium Spinner Modified), L 15 (L 15 Leibowitz).

Im Falle eines jeden Mediums wurden $ZnCl_2$ -Konzentrationen zwischen $1,5 \times 10^{-4}$ und $4,5 \times 10^{-4}$ M untersucht. Hier ist immer der höchste Stimulationswert für das jeweilige Medium angegeben.

314 Zellzahl

Zur Bestimmung der optimalen Zelldichte für die Zn^{++} -Stimulation peripherer Lymphozyten wurde in einer Reihe von Versuchen die Leukozytenzahl im Kulturansatz variiert. Dabei lag die optimale Transformationsrate zwischen $1,0$ und $1,5 \times 10^6$ Zellen pro ml und zeigte im Bereich zwischen $1,5$ und $3,0 \times 10^6$ einen allmählichen Abfall. $0,5 \times 10^6$ Leukozyten/ml ergaben suboptimale Werte (Abb. 1). Es ergab sich aus diesen Ergebnissen, daß für alle weiteren Versuche die Zellzahl auf $1,0 \times 10^6$ Leukozyten pro ml Kulturansatz eingestellt wurde.

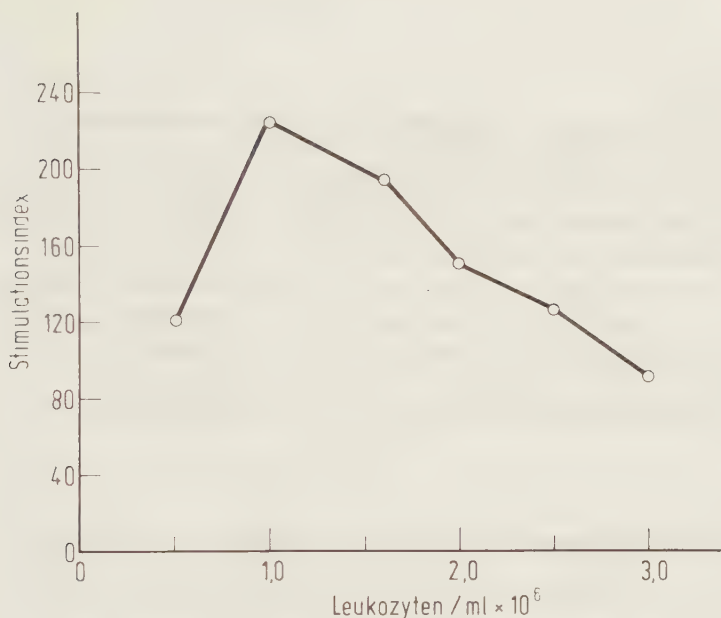


Abb. 1

Der Einfluß der Leukozytenzahl pro ml Kulturansatz auf die Zn^{++} -Stimulation menschlicher peripherer Lymphozyten. Der Stimulationsindex (Verhältnis mittlerer cpm unbehandelter zu mittleren cpm Zn^{++} -behandelter Kulturen aus Dreifachansätzen) wurde eingetragen.

315 Plasma - Serum

Beim Vergleich von autologem Plasma und autologem Serum bestanden keine wesentlichen Unterschiede in der TdR^3H -Aufnahme Zn^{++} -stimulierter Kulturen (Tab. IV). Auffällig war jedoch in mehreren Versuchen der höhere Einbau unstimulierter Kulturen bei Verwendung von Serum. Für alle weiteren Versuche wurde autologes Plasma verwendet, was

Tab. IV

Zn⁺⁺-Stimulation menschlicher peripherer Lymphozyten in autologem Plasma und Serum

ZnCl ₂ -Konzentration	Autologes Plasma		Autologes Serum	
	Zn*	SI	Zn*	SI
Kein Zusatz	2 347	--	5 622	--
2,5 x 10 ⁻⁴ M	102 933	44	109 335	19
3,0 x 10 ⁻⁴ M	118 931	51	123 821	22
3,5 x 10 ⁻⁴ M	148 855	63	148 819	26

* TdR³H-Aufnahme (mittlere cpm aus Dreifachansätzen).

auch aus ökonomischen Gründen sinnvoller ist, da die notwendige Plasmamenge bereits bei Gewinnung der Zellen anfällt, während für Serum zusätzliches Blut abgenommen werden muß.

316 Verhältnis Plasma- /Zinkkonzentration

Zur Bestimmung des optimalen Prozentsatzes an autologem Plasma für die Zink-Stimulation wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der der Plasmaanteil des Kulturansatzes zwischen 10 und 50 % variiert wurde (Tab. V). Dabei fand sich die höchste Stimulation stets bei Verwendung von 30 % Plasma und ZnCl₂-Konzentrationen um 3,0 x 10⁻⁴ M. Zusätzlich konnte festgestellt werden, daß eine Abhängigkeit der TdR³H-Aufnahme von dem Verhältnis Plasma zu Stimulans bestand. Bei Verwendung von hohen Plasmakonzentrationen wurde die höchste Stimulation mit hohen ZnCl₂-Konzentrationen (4,0 x 10⁻⁴ M) gefunden. Dagegen lag die optimale Plasmakonzentration für niedrige Zink-Konzentrationen bei 10 %.

Tab. V

Die Abhängigkeit der Zn^{++} -Stimulation menschlicher peripherer Lymphozyten vom Prozentsatz autologen Plasmas im Kulturansatz. TdR^3H -Aufnahme wurde in ZnCl_2 -behandelten Kulturen und unbehandelten Kontrollen gemessen und der Stimulationsindex berechnet.

ZnCl_2 -Konzentration	Prozentsatz des autologen Plasmas				
	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %
$1,5 \times 10^{-4}$ M	19	17	13	7	1
$2,5 \times 10^{-4}$ M	20	39	37	15	5
$3,0 \times 10^{-4}$ M	<1	1	94	53	16
$4,0 \times 10^{-4}$ M	<1	<1	3	65	79

32 Variabilität der Zn^{++} -Stimulation von Lymphozytenkulturen

321 Variabilität bei einem größeren Spenderkollektiv

Lymphozytenkulturen von 50 unausgewählten gesunden Versuchspersonen wurden unter den oben gefundenen standardisierten Optimalbedingungen mit Zink stimuliert und jeweils mit unbehandelten Kontrollkulturen verglichen. Dabei wurde in allen Zn^{++} -behandelten Kulturen eine erhebliche Steigerung des TdR^3H -Einbaues nach 144 h gefunden. Die stimulierten Kulturen wiesen jedoch eine große Variabilität hinsichtlich des Ausmaßes der DNA-Synthese auf (cpm-Werte zwischen 34685 und 293567, SI-Werte zwischen 25 und 266 - Abb. 2).

322 Individuelle Variabilität

Um zu prüfen, ob die in der Zink-Stimulation der Lymphozyten festgestellten Unterschiede individuell konstante Eigenschaften darstellen, wurde eine weitere Versuchsserie durchgeführt, wobei Lymphozyten einiger Spender mehrmals innerhalb eines Zeitraumes von 8 Wochen kultiviert wurden. Dabei entsprachen die Unterschiede der Zn^{++} -Stimulation in den Kulturen des gleichen Spenders durchaus der Variabilität, die zwischen den Kulturen verschiedener Spender gefunden worden waren (Abb. 3).

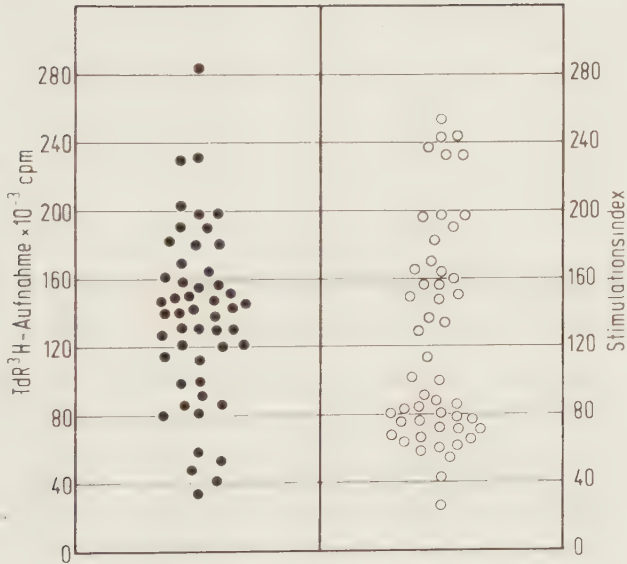


Abb. 2

Die Zn^{++} -Stimulation peripherer Lymphozytenkulturen von 50 gesunden Blutspendern, ausgedrückt in TdR³H-Aufnahme (mittlere cpm aus Dreifachansätzen) und Stimulationsindex.

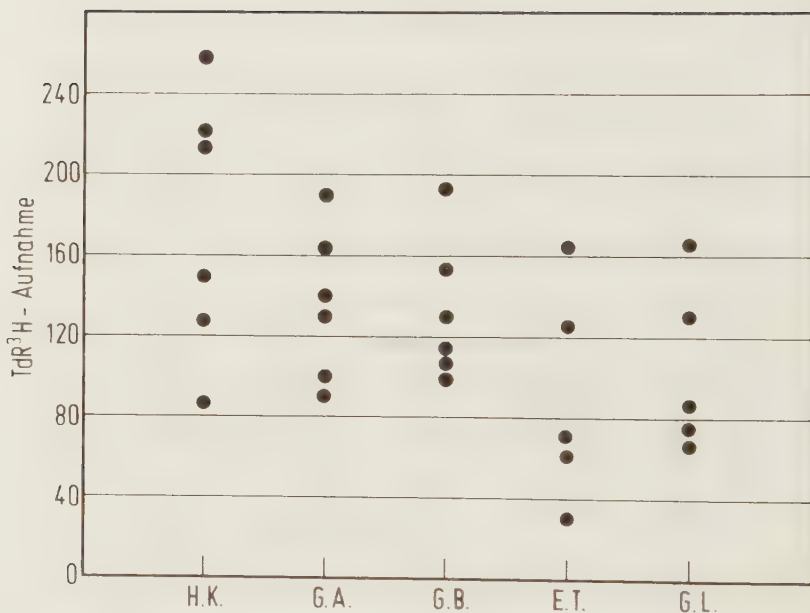


Abb. 3

Zink-Stimulation der Lymphozytenkulturen von 5 gesunden Spendern bei mehrmaliger Untersuchung innerhalb von 8 Wochen.

33 Ursachen der Variabilität

Für die trotz standardisierter Versuchsbedingungen gefundene Variabilität zwischen Kulturen verschiedener Spender und auch der gleichen Spender bei mehrfacher Untersuchung gibt es zunächst zwei Erklärungen, nämlich der variierende Prozentsatz Lymphozyten im Kulturansatz und Unterschiede des jeweils verwendeten autologen Plasmas.

331 "Reine" Lymphozytenpopulationen

Um gleiche Kulturbedingungen hinsichtlich der Zusammensetzung der weißen Blutzellen zu schaffen, wurden 95 - 99 % "reine" Lymphozytenpopulationen gewonnen und mit Parallelkulturen verglichen, die in üblicher Weise aus dem leukozytenreichen Überstand gewonnen worden waren (Tab. VI). Hierbei ergab sich für die säulenvorbehandelten "reinen" Lymphozytenkulturen eine stark abgeschwächte Zinkstimulation, obwohl sich bei Verwendung der Trypanblaumethode keine Hinweise für eine Schädigung der Zellen durch die Säulenbehandlung ergaben.

332 Prozentsatz Lymphozyten im Kulturansatz

Von einer Anzahl gesunder Versuchspersonen wurden Lymphozytenkulturen angelegt und jeweils der Prozentsatz Lymphozyten im Kulturansatz bestimmt und zur TdR³H-Aufnahme der Zink-stimulierten Kulturen am Ende der 144stündigen Kulturdauer in Beziehung gesetzt. Hier konnte gezeigt

Tab. VI

Der Vergleich der Zn^{++} -Stimulation des leukozytenreichen Überstandes mit den "säulengereinigten" Lymphozytenpopulationen.

"ungereinigt"				"gereinigt"		
Versuch	%Lympho**	Kontrollen*	Zn*	%Lympho**	Kontrollen*	Zn*
I 7	36,4	414	90 686	98,3	304	762
I 8	33,6	584	134 393	99,5	497	4 282
K 2	33,4	1 058	199 401	99,6	1 080	4 320
K 5	62,4	840	135 972	97,3	894	9 157
K 9	53,2	719	132 324	99,5	696	10 462
L 5	35,3	849	194 580	98,5	1 060	4 723

* TdR³H-Aufnahme (mittlere cpm aus Dreifachansätzen)

** Differenzierung des Kulturansatzes

werden, daß keine Beziehungen bestehen zwischen der Höhe der Zinkstimulation und dem Prozentsatz Lymphozyten im Kulturansatz (Abb. 4).

333 Plasmaersatzstoffe

Wegen der möglichen Beeinflussung der Lymphozytenstimulation durch Faktoren des autologen Plasmas wurde versucht, es durch Humanserum-Ultrafiltrat, 20 %ige Humanalbuminlösung, 5 %ige Glukose und 6 %iges Dextran zu ersetzen. Dabei wurde der Prozentsatz der Plasmaersatzstoffe zwischen 30 und 5 % und die $ZnCl_2$ -Konzentration zwischen $1,0 \times 10^{-5}$ und $6,0 \times 10^{-4}$ M variiert. In diesen Versuchen konnte keine Lymphozytenstimulation durch Zink gefunden werden.

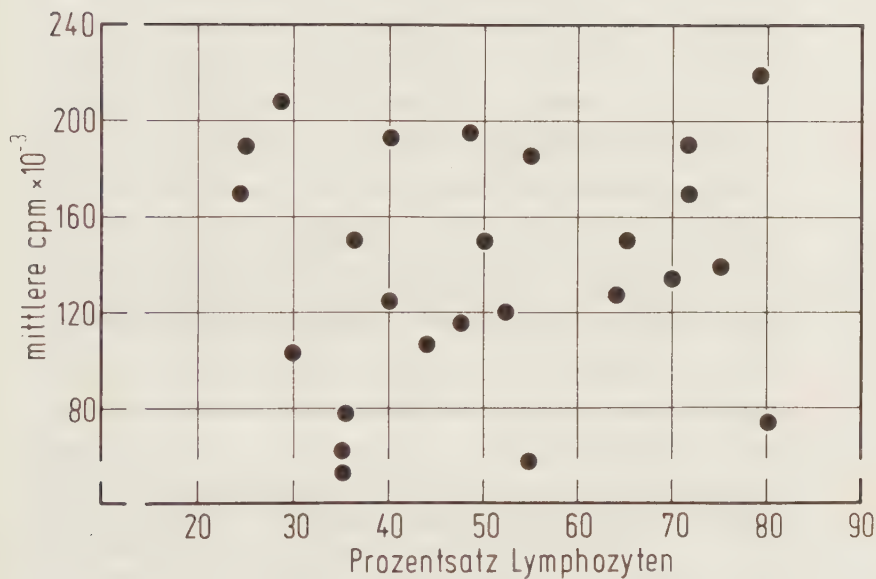


Abb. 4

Die Beziehung der Zn^{++} -Stimulation menschlicher peripherer Lymphozytenkulturen (mittlere cpm aus Dreifachansätzen) zum Prozentsatz Lymphozyten im Kulturansatz.

334 Fetales Kalbsserum (FKS) als Plasmaersatz

Bei der Untersuchung von Lymphozytenkulturen ist die Verwendung von FKS weit verbreitet. Es hatte jedoch in unserem System selbst eine stimulierende Wirkung auf Kulturen menschlicher Lymphozyten, die in Versuchen mit verschiedenen Blutspendern unterschiedlich stark ausgeprägt war (Tab. VII). Bei 5 % FKS im Kulturmedium zeigte sich eine geringfügige Stimulation durch Zink (Stimulationsindex zwischen 2 und 4), die auch durch Erhöhung des Prozentsatzes an Serum nicht verbessert werden konnte (Tab. VIII). FKS erscheint deshalb ungeeignet für die Stimulation menschlicher Lymphozyten durch Zn^{++} .

335 AB-Plasma statt autologem Plasma

Da im plasmafreien Medium keine Zinkstimulation erzielt werden konnte, wurde nunmehr auf eine andere Weise versucht, die Einflüsse des autologen Plasmas auszuschließen. In einer Reihe von Versuchen wurde das Plasma in Lymphozytenkulturen verschiedener Spender durch frisches AB-Plasma eines einzigen Spenders (ebenfalls 30 %) ersetzt (Tab. IX). Dabei zeigte es sich, daß die Lymphozyten im Fremdplasma immer etwas geringer stimuliert wurden, als im Eigenplasma, daß jedoch die Variabilität zwischen den Ergebnissen der einzelnen Spender auch bei Verwendung desselben AB-Plasmas erhalten blieb.

Tab. VII

Zn⁺⁺-Stimulation menschlicher peripherer Lymphozyten bei Ersatz autologen Plasmas durch FKS (5 % im Kulturansatz)

ZnCl ₂ -Konzentration	Versuch I*	Versuch II*	Versuch III*
Kein Zusatz	16 375	6 208	31 831
1,5 x 10 ⁻⁴ M	2 798	647	2 036
0,7 x 10 ⁻⁴ M	50 741	21 826	51 637
0,3 x 10 ⁻⁴ M	24 315	12 167	64 774
0,1 x 10 ⁻⁴ M	14 201	6 340	36 840

* TdR³H-Aufnahme (mittlere cpm) aus Dreifachansätzen ermittelt. Unbehandelte Kontrollkulturen in autologem Plasma zeigten weniger als 1000 cpm in diesen Experimenten.

Tab. VIII

Zn⁺⁺-Stimulation menschlicher peripherer Lymphozyten bei Substitution des autologen Plasmas durch FKS (jeweils 5, 10 und 20 % vom Kulturansatz). TdR³H-Aufnahme 144 h nach Zinkgabe (mittlere cpm aus Dreifachansätzen).

ZnCl ₂ -Konzentrationen	Fetales Kalbsserum		
	20 %	10 %	5 %
Kein Zusatz	119 468	91 582	32 308
1,5 x 10 ⁻⁴ M	41 138	80 069	2 043
0,7 x 10 ⁻⁴ M	60 166	89 224	6 124
0,3 x 10 ⁻⁴ M	110 803	106 708	52 338
0,1 x 10 ⁻⁴ M	131 508	117 895	65 956

Tab. IX

Zn⁺⁺-Stimulation menschlicher peripherer Lymphozyten
von 8 Individuen in identischem frischen AB-Plasma
(30 % im Kulturansatz)

Spender	autologes Plasma*	AB-Plasma*
S. H.	151 095	102 839
L. M.	187 817	141 617
E. U.	118 538	82 631
T. U.	129 752	93 300
A. G.	147 043	138 874
F. H.	136 848	97 410
F. C.	194 134	162 348
S. W.	152 699	128 304

* TdR³H-Aufnahme (mittlere cpm aus Dreifachansätzen).

4 Diskussion

Die Lymphozytenkultur stellt im Vergleich zu den meisten anderen immunologischen Modellen ein relativ einfaches Versuchssystem dar. Dennoch werden die Ergebnisse wesentlich beeinflusst durch eine größere Anzahl von Kulturvariablen, wie im Falle PHA-stimulierter Lymphozytenkulturen von verschiedenen Autoren gezeigt worden ist (24, 39, 49, 59, 67). Die Kinetiken der neu entdeckten Zinkstimulation menschlicher peripherer Lymphozyten unterscheiden sich wesentlich von denen der PHA-Stimulation (58). Deshalb erschien es notwendig, auch eine methodologische Studie der Zn^{++} -Stimulation in Anlehnung an die oben zitierten Arbeiten durchzuführen. Dabei sollten einerseits die optimalen Kulturbedingungen definiert werden und andererseits der Normbereich der Zinkstimulation bei Untersuchung eines Kollektives gesunder Versuchspersonen festgestellt werden. Letzteres ist notwendig als Voraussetzung für weitere Untersuchungen bei lymphoproliferativen Erkrankungen, wo im Falle anderer Stimulantien eine erheblich herabgesetzte Transformation der Lymphozyten in vitro festgestellt worden war (20, 22, 45).

Die Unterschiede in der Kulturtechnik verschiedener Autoren beginnen schon bei der Aufarbeitung des gewonnenen Blutes. Während einige das Blut ohne Zusatz sedimentieren lassen, werden bei den meisten Untersuchungen hochpolymere Sub-

stanzen wie z.B. Dextran zur Verbesserung der Sedimentation zugesetzt. Es konnte gezeigt werden, daß Dextran, obwohl es die PHA-Stimulation beeinflussen soll (67), das Ausmaß der Stimulation durch Zn^{++} nicht verändert und darum unbedenklich als sedimentationsförderndes Agens verwendet werden kann.

Bei der Untersuchung der PHA-Stimulation hatten sich vor allem Kulturgefäße bewährt, bei denen die den Zellen zur Verfügung stehende Fläche möglichst klein ist (24).

Weiterhin war eine Korrelation zwischen dieser sogenannten "surface area" und der Zelldichte in der Kultur festgestellt worden (39). Entsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit optimale Stimulation in Kultur r ö h r c h e n bei einer Zellzahl von $1,0 \times 10^6$ Leukozyten pro ml gefunden. Im Gegensatz zu einer anderen Arbeit (3) konnte ein Unterschied zwischen Glas- und Plastikgefäßen des gleichen Typs nicht festgestellt werden.

Neben Zelldichte und Kulturgefäßtyp spielen vor allem die Wahl eines geeigneten Kulturmediums sowie Art und Prozentsatz des dem Medium zuzufügenden Serums eine wichtige Rolle. Für Lymphozytenkulturen werden eine Reihe von Standardmedien verwendet, am häufigsten MEM, MEM-Spinner, TC 109 und TC 199. Hinweise, daß etwa eines dieser Medien anderen überlegen sei, finden sich in der Literatur nicht. Bei PHA-Stimulation war in vergleichenden Untersuchungen

zwischen MEM und TC 199 kein Unterschied gefunden worden (59). Es war in der vorliegenden Arbeit überraschend festzustellen, daß in dem System der Zn^{++} -stimulierten Lymphozytenkultur erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Medien bestanden. Dabei ergab sich eindeutig, daß mit MEM konstant die besten Ergebnisse erzielt werden konnten. Daß TC 199 die Stimulation durch Zn^{++} so schlecht unterstützt, erklärt die niedrige Transformationsrate in den ersten veröffentlichten Versuchen (30). Es wäre interessant zu untersuchen, welche Bestandteile der einzelnen Medien für die Unterschiede der Zinkstimulation verantwortlich sind. Dies scheint jedoch wegen der Vielzahl von qualitativen und quantitativen Unterschieden, die zwischen diesen Medien bestehen, kaum durchführbar zu sein.

In den Experimenten verschiedener Autoren wird den Lymphozytenkulturen entweder autologes Plasma, autologes Serum, homologes Serum und Plasma oder fetales Kalbsserum (FKS) zugefügt. FKS hat jedoch, wie bereits mehrfach beschrieben (25, 59, 67), selbst eine stimulierende Wirkung auf menschliche Lymphozyten, was auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Diese "Spontantransformation" war in Kulturen verschiedener Blutspender unterschiedlich hoch und abhängig vom Prozentsatz FKS im Medium. Es ergab sich bei der Verwendung von FKS für Zink-stimulierte Kulturen nur ein geringgradiger Stimulationsindex, so daß dieses Serum im System Zn^{++} -stimulierter Kulturen für weitere Experimente nicht geeignet ist.

Beim Vergleich von autologem Plasma und Serum ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede, was das Ausmaß der Zinkstimulation betrifft. Auffällig war lediglich ein im Durchschnitt auf das Dreifache erhöhter Leerwert bei Verwendung von Serum - ein Phänomen, für das im Augenblick keine plausible Erklärung vorliegt. Homologes Plasma war autologem Plasma deutlich unterlegen. Der optimale Plasmaprozentsatz lag bei 30 % entsprechend anderen Untersuchungen an PHA-stimulierten Lymphozytenkulturen (29).

Nachdem es im ersten Teil der Experimente gelungen war, die optimalen Bedingungen für die Zn^{++} -Stimulation menschlicher peripherer Lymphozyten zu definieren, wurde mit diesen standardisierten Versuchsbedingungen eine Gruppe von 50 gesunden Blutspendern untersucht. Dabei bestanden erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen gesunden Versuchspersonen. Ähnliche Unterschiede wurden auch dann gefunden, wenn die gleiche Person mehrfach in einem Zeitraum von einigen Wochen untersucht wurde. Eine vergleichbar große Schwankungsbreite war auch in PHA-stimulierten Kulturen gefunden worden, und zwar ebenfalls sowohl bei Längsschnittuntersuchungen als auch bei Querschnittuntersuchungen (35, 48).

Für diese erheblichen Schwankungen, die trotz standardisierter Versuchsbedingungen bestehen bleiben, gibt es zunächst zwei Erklärungsmöglichkeiten, denn zwei Punkte

konnten in diesen Versuchen nicht standardisiert werden. Einerseits variierte der Prozentsatz Lymphozyten im zellreichen Überstand (und damit im Kulturansatz) in den einzelnen Experimenten und zum anderen ist es durchaus denkbar, daß Faktoren des jeweils verwendeten autologen Plasmas die Zinkstimulation beeinflussen, wie bei PHA beschrieben (2, 35). Eine Möglichkeit, bei allen Experimenten mit vergleichbaren Lymphozytenmengen zu arbeiten, besteht darin, daß man die Lymphozyten von den anderen Zellen trennt, indem die Haftfähigkeit von Monozyten und Granulozyten an Nylonwatte (oder anderen Substanzen mit großer Oberfläche) ausgenützt wird (10, 55). Dieses Standardverfahren ergibt 95 - 99 % "reine" Lymphozyten und hat keinen schädlichen Einfluß auf die Vitalität der Zellen (43). Auch in der vorliegenden Untersuchung bestanden im Trypanblau-Test keine Unterschiede zwischen "gereinigten" Lymphozytenpopulationen und Mischpopulationen aus dem normalen leukozytenreichen Überstand. Darüber hinaus war im gleichen System die PHA-Stimulation getrennter und ungetrennter Populationen gleich hoch (29). Die Stimulationswirkung von Zink war jedoch in Kulturen reiner Lymphozyten erheblich herabgesetzt, wenn sie mit Parallelkulturen des gleichen Spenders aus dem leukozytenreichen Überstand verglichen wurden. Ein ähnliches Phänomen ist im Falle Antigen-stimulierter Kulturen beschrieben und ausführlich diskutiert worden (19, 43). Nach den Ergebnissen dieser Autoren scheint das Fehlen der Monozyten im Kulturansatz für die verringerte Stimulation ver-

antwortlich zu sein, weil durch Zusatz autologer Monozyten die Stimulation säulengetrennter Kulturen wieder auf normale Werte anstieg. Die Ursache für die verringerte Zinkstimulation "gereinigter" Lymphozyten ist aus den durchgeführten Experimenten nicht abzuleiten. Es ergab sich jedoch im Rahmen der vorliegenden Fragestellung, daß "gereinigte" Lymphozytenpopulationen zur Untersuchung der Zinkstimulation nicht verwendet werden können und man somit weiterhin auf den ungetrennten leukozytenreichen Überstand angewiesen ist. Dies ist jedoch möglich, da gezeigt werden konnte, daß keine Abhängigkeit der Stimulation vom Prozentsatz Lymphozyten im Kulturansatz bestand.

Um Faktoren des autologen Plasmas als mögliche Ursache der Variabilität der Zinkstimulation auszuschließen, wurde versucht, menschliche Lymphozytenkulturen im plasmafreien Milieu mit Zink zu stimulieren. Im Gegensatz zu vergleichbaren Untersuchungen mit PHA (7) konnte jedoch eine Zn^{++} -Stimulation der Lymphozyten im plasmafreien Medium nicht festgestellt werden. Dabei waren als Plasmaersatz isotone Lösungen von Glukose, Humanalbumin und Dextran verwendet worden. Andere Autoren haben weitaus kompliziertere plasmafreie Medien bei der Lymphozytenstimulation verwendet (13, 64). Die Möglichkeit, daß in derartigen Medien auch eine positive Zinkstimulation gefunden wird, ist nicht auszuschließen.

Der Einfluß des autologen Plasmas kann auch verhindert werden, wenn die Zellen des leukozytenreichen Überstandes verschiedener Spender gewaschen und dann im AB-Plasma eines einzigen Spenders aufgenommen werden. In diesen Experimenten blieb beim Vergleich der Kulturen im AB-Plasma mit den Eigenplasmakontrollen die Variabilität etwa im gleichen Ausmaß erhalten. Deshalb scheinen Unterschiede des autologen Plasmas nicht für die Variabilität der Zinkstimulation von Lymphozytenkulturen gesunder Spender verantwortlich zu sein.

Aus der Tatsache, daß Plasmafaktoren nicht entscheidend waren, daß auch der Prozentsatz Lymphozyten im Kulturansatz keine Rolle spielte und alle übrigen Versuchsbedingungen standardisiert waren, möchte man annehmen, daß tatsächlich funktionelle Unterschiede der Lymphozyten zur Zeit der Blutentnahme die Ursache der Variabilität darstellen. Funktionelle Klassen der Lymphozyten sind bei Verwendung verschiedener Methoden in letzter Zeit beschrieben worden (siehe z.B. 28, 56, 57). Es ist denkbar, daß durch Zink nur eine Subpopulation der heterogenen Zellklasse der Lymphozyten aktiviert wird und daß der Anteil dieser Subpopulation zur Zeit der Blutentnahme jeweils unterschiedlich hoch ist.

Nach den bisherigen Ergebnissen scheint es so zu sein, daß für die Stimulation menschlicher Lymphozyten durch Zink Plasmafaktoren notwendig sind (siehe jedoch den

Einwand auf Seite 32). Für Wechselwirkungen zwischen Zn^{++} und Plasmafaktoren spricht auch die gefundene Abhängigkeit der Stimulation von dem Verhältnis Zink-/Plasmakonzentration. Dabei handelt es sich vermutlich um Serum p r o t e i n e, da auch im menschlichen Serum-ultrafiltrat keine Stimulation gefunden worden war. In vivo und in vitro wird Zink an verschiedene Serumproteine gebunden (9, 46, 54) und es ist möglich, daß eine vergleichbare Bindung eine wichtige Rolle bei der Stimulation der Lymphozyten durch Zn^{++} spielt.

5 Zusammenfassung

Für das Modell der Zn^{++} -Stimulation menschlicher peripherer Lymphozyten wurden die optimalen Kulturbedingungen bestimmt. Es wurde bei Verwendung von Kultur r ö h r c h e n (Glas oder Plastik), Eagles Minimal Essential Medium, 30 % autologem Plasma und einer Zelldichte von $1,0 \times 10^6$ Leukozyten pro ml maximale Stimulation gefunden (Zinkkonzentrationen von $2,6 \times 10^{-4}$ bis $3,0 \times 10^{-4}$ M). Zusätzlich konnte eine Abhängigkeit der Stimulation vom Verhältnis Zink-/Plasma-Konzentration festgestellt werden.

Es bestand kein Unterschied zwischen autologem Plasma und Serum, während homologes Plasma dem autologem unterlegen war. Fetales Kalbsserum zeigte selbst eine stimulatorische Wirkung und war deshalb als Plasmaersatz ungeeignet. In 95 - 98 % "reinen" Lymphozytenpopulationen ergab sich eine erheblich geringere Zn^{++} -Stimulation gegenüber Parallelkulturen aus ungetrenntem leukozytenreichen Überstand.

Bei Untersuchungen eines Kollektivs von 50 gesunden Blutspendern und bei Mehrfachuntersuchungen der gleichen Individuen bestand eine beträchtliche Variabilität der Zinkstimulation. Diese war nicht durch den wechselnden Prozentsatz Lymphozyten im Kulturansatz bedingt. Offenbar spielten auch Unterschiede des jeweils verwendeten autologen Plasmas keine Rolle, da Lymphozytenkulturen von verschiedenen Spendern im AB-Plasma eines Spenders eine vergleichbare Variabi-

lität aufwiesen. Da die übrigen Kulturbedingungen streng standardisiert waren, kommen als Ursachen für die Variabilität endogene Eigenschaften der Lymphozyten selbst in Betracht.

Im plasmafreien Milieu ließen sich Lymphozyten nicht durch Zink stimulieren, auch nicht bei Ersatz des Plasmas durch menschliches Serumultrafiltrat. Die mögliche Bedeutung von Serumproteinen für die Stimulation von Lymphozyten in vitro durch Zink wurde diskutiert.

6 Literaturverzeichnis

1. ALFORD, R.H.:
Metal cation requirements for Phytohemagglutinin-induced transformation of human peripheral blood lymphocytes.
J.Immunol. 104, 698 - 703 (1970).
2. ALFORD, R.H.:
The effects of autologous plasma on human lymphocyte transformation.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 133, 1443 - 1446 (1970).
3. BAIN, B., and LOWENSTEIN, L.:
Effect of glass and plastic culture tubes on the mixed leukocyte reaction.
J.Lab.Clin.Med. 71, 1045 - 1048 (1968).
4. BAIN, B., VAS, M.R., and LOWENSTEIN, L.:
The development of large immature mononuclear cells in mixed leukocyte cultures.
Blood 23, 108 - 116 (1964).
5. BARKER, B.E., and FARNES, P.:
Histochemistry of blood cells treated with Pokeweed mitogen.
Nature 214, 787 - 789 (1967).
6. BARKER, B.E., and FARNES, P.:
Mitogenic property of Wistaria floribunda seeds.
Nature 215, 659 - 660 (1967).
7. BERGMAN, B., BÖRJESON, J., LÖW, B., and NORDÉN, Å.:
Substitution of plasma in culture medium with dextran, glucose or albumin for in vitro studies of lymphocytes.
Scand J.Haemat. 4, 176 - 180 (1967).
8. BOYD, W.C.:
The lectins: their present status.
Vox sang. 8, 1 - 32 (1963).
9. BOYETT, J.D., and SULLIVAN, J.F.:
Distribution of protein - bound zinc in normal and cirrhotic serum.
Metabolism 19, 148 - 157 (1970).

10. BRANDT, L., BÖRJESON, J., NORDÉN, Å., and OLSON, I.:
Separation of lymphocytes from peripheral blood by means of a glass wool column.
Acta med.scand. 172, 459 - 462 (1962).
11. CARON, G.A., POUTALA, S., and PROVOST, T.T.:
Lymphocyte transformation induced by inorganic and organic mercury.
Int.Arch.Allergy 37, 76 - 87 (1970).
12. Cell-mediated immune responses.
Report of a WHO scientific group.
Int.Arch.Allergy 36, (1969).
13. COULSON, A.S., CHALMERS, D.G., and PATH, M.C.:
Lack of demonstrable IgG in phytohaemagglutinin-stimulated human transformed cells cultured in a serum-free medium.
Transplantation 5, 547 - 548 (1970).
14. ELVES, M.W., ROATH, S., and ISRAELS, M.C.G.:
The response of lymphocytes to antigen challenge in vitro.
Lancet 1963 I, 806 - 807.
15. FORSDYKE, D.R.:
Quantitative nucleic acid changes during phyto-haemagglutinin - induced lymphocytes transformation in vitro.
Dependence of the response on phytohaemagglutinin/serum ratio.
Biochem.J. 105, 679 - 684 (1967).
16. GOWANS, J.L., and MCGREGOR, D.D.:
The immunological activities of lymphocytes.
Progr.Allergy 9, 1 - 78 (1965).
17. GRÄSBECK, R., NORDMAN, C., and de la CHAPELLE, A.:
Mitogenic action of antileukocyte immune serum on peripheral leukocytes in vitro.
Lancet 1963 II, 385 - 386.
18. HEDESKOV, C.J.:
Early effects of Phytohaemagglutinin on glucose metabolism of normal human lymphocytes.
Biochem.J. 110, 373 - 380 (1968).

19. HERSH, E.M., and HARRIS, J.E.:
Macrophage-lymphocyte interaction in the antigen-induced blastogenic response of human peripheral blood leukocytes.
J.Immunol. 100, 1184 - 1194 (1968).
20. HERSH, E.M., and OPPENHEIM, J.J.:
Impaired in vitro lymphocyte transformation in Hodgkin's disease.
New Engl.J.Med. 273, 1006 - 1011 (1965).
21. HIRSCHHORN, R., HIRSCHHORN, K., and WEISSMANN, G.:
Appearance of hydrolase rich granules in human lymphocytes induced by Phytohaemagglutinin and Antigens.
Blood 30, 84 - 102 (1967).
22. HIRSCHHORN, K., SCHREIBMAN, R.R., BACH, F.H., and SILTZBACH, L.E.:
In vitro-studies of lymphocytes from patients with sarcoidosis and lymphoproliferative diseases.
Lancet 1964 II, 842 - 843.
23. HIRSCHHORN, K., SCHREIBMAN, R.R., VERBO, S., and GRUSKIN, R.H.:
The action of streptolysin S on peripheral lymphocytes of normal subjects and patients with acute rheumatic fever.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 52, 1151 - 1157 (1964).
24. HUGHES, D., and CASPARY, E.A.:
Lymphocyte transformation in vitro measured by tritiated thymidin uptake I.Lymphocyte culture techniques.
Int.Arch.Allergy 37, 506 - 531 (1970).
25. JOHNSON, G.J., and RUSSEL, P.S.:
Reaction of human lymphocytes in culture to components of the medium.
Nature 208, 343 - 345 (1965).
26. KAY, J.E.:
Phytohaemagglutinin: an early effect on lymphocyte lipid metabolism.
Nature 219, 172 - 173 (1968).

27. KILLANDER, D., and RIGLER, R., Jr.:
Initial changes of desoxyribonucleoprotein and
synthesis of nucleic acid in Phytohemagglutinine-
stimulated human leucocytes in vitro.
Exp.Cell Res. 39, 701 - 704 (1965).
28. KINOCHITA, Y., KIMURA, S., TAKESHITA, T., KIMURA, E.,
YUKIOKA, M., and MORISAWA, S.:
Isolation of heterogenous lymphocytes according to
their cellular densities by multilayer centrifugation
and detection of the separated fraction containing
the immunological memory cells.
Exp.Cell Res. 59, 299 - 306 (1970).
29. KIRCHNER, H.:
Unveröffentlichte Experimente.
30. KIRCHNER, H., and RÜHL, H.:
Stimulation of human peripheral lymphocytes by Zn^{2+}
in vitro.
Exp.Cell Res. 61, 229 - 230 (1970).
31. KIRCHNER, H. und RÜHL, H.:
Stimulation menschlicher Blutlymphozyten durch Zink-
salze in vitro.
II. Arbeitstagung über Leukozytenkulturen (im Druck
1971).
32. KLEIN, G.:
Immunological factors affecting tumour growth.
Brit.Med.J. 4, 418 (1970).
33. LING, N.R.:
Lymphocyte stimulation.
North Holland Publishing Comp.
Amsterdam 1968.
34. LING, N.R., SPICER, E., JAMES, K., and WILLIAMSON, N.:
The activation of human peripheral lymphocytes by
products of staphylococci.
Brit.J.Haemat. 11, 421 - 431 (1965).
35. MCINTYRE, O.R., and COLE, A.F.:
Variation in the response of normal lymphocytes to PHA.
Int.Arch.Allergy 35, 105 - 118 (1969).

36. MCINTYRE, O.R., and EBAUGH, F.G., Jr.:
The effect of Phythemagglutinin on leukocyte cultures as measured by P³² Incorporation in the DNA, RNA, and acid soluble fractions.
Blood 19, 443 - 453 (1962).
37. MACKINNEY, A.A., Jr., STOHLMAN, F., Jr., and BRECHER, G.:
The kinetics of cell proliferation in cultures of human peripheral blood.
Blood 19, 349 - 357 (1962).
38. MICHALOWSKI, A.:
Time-Course of DNA synthesis in human leukocyte cultures.
Exp.Cell Res. 32, 609 - 612 (1963).
39. MOORHEAD, J.F., CONNOLLY, J.J., and McFARLAND, W.:
Factors affecting the reactivity of human lymphocytes in vitro.
I. Cell number, duration of culture and surface area.
J.Immunol. 99, 413 - 419 (1967).
40. NASPITZ, Ch.K., and RICHTER, M.:
The action of phytohemagglutinin in vivo and in vitro, a review.
Prog.Allergy 12, 1 - 85 (1968).
41. NOWELL, P.C.:
Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes.
Cancer Res. 20, 462 - 466 (1960).
42. OPPENHEIM, J.J.:
Relationship of in vitro lymphocyte transformation to delayed hypersensitivity in guinea pig and man.
Fed.Proc. 27, 21 - 28 (1968).
43. OPPENHEIM, J.J., LEVENTHAL, B.G., and HERSH, E.M.:
Transformation of column-purified lymphocytes with nonspecific and specific antigenic stimuli.
J.Immunol. 101, 262 - 270 (1968).

44. OPPENHEIM, J.J., ROGENTINE, G.N., and TERRY, W.D.:
The transformation of human lymphocytes by monkey antisera to human immunoglobulins.
Immunology 16, 123 - 138 (1969).
45. OPPENHEIM, J.J., WHANG, J., and FREI, E.:
Immunologic and cytogenic studies of chronic lymphocytic leukemic cells.
Blood 26, 121 - 132 (1965).
46. PARISI, A.F., and VALLEE, B.L.:
Isolation of a zinc α_2 -macroglobulin from human serum.
Biochemistry 9, 2421 - 2426 (1970).
47. PEARMAIN, G., LYCETTE, R.R., and FITZGERALD, P.H.:
Tuberculin-induced mitosis in peripheral blood leucocytes.
Lancet 1963 I, 637 - 638 (1963).
48. PARKER, J.W., and LUKES, R.J.:
The variability of PHA - induced lymphocyte transformation in repetitive studies in
Proc. IIIrd annual leucocyte culture conference
(ed. W.O. Rieke).
Appleton Century Crofts, New York 1969.
49. PENTYCROSS, C.R.:
Technique for lymphocyte transformation.
J.clin.Path 21, 175 - 178 (1968).
50. POGO, G.T., ALLFREY, V.G., and MIRSKY, A.E.:
RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes.
Pro.Natl.Acad.Sci. USA 55, 805 - 812 (1966).
51. PORIES, W.J., HENZEL, J.H., ROB, Ch.G., and STRAIN, W.H.:
Acceleration of wound healing in man with zinc sulphate given by mouth.
Lancet 1967 I, 121 - 124.
52. POWELL, A.E., and LEON, M.A.:
Reversible interaction of human lymphocytes with the mitogen Concanavalin A.
Exp.Cell Res. 62, 315 - 325 (1970).

53. PRASAD, A.S., and OBERLEAS, D.:
Zink: human nutrition and metabolic Effects
Review.
An.Int.Med. 73, 631 - 636 (1970).
54. PRASAD, A.S., and OBERLEAS, D.:
Binding of zinc to amino acids and serum
proteins in vitro.
J.Lab.Clin.Med 76, 416 - 425 (1970).
55. RABINOWITZ, Y.:
Separation of lymphocytes, polymorphonuclear
leukocytes and monocytes on glass columns
including tissue culture observations.
Blood 23, 811 - 828 (1964).
56. RAFF, M.C.:
Two distinct populations of peripheral
lymphocytes in mice distinguishable by
immunofluorescence.
Immunology 19, 637 - 650 (1970).
57. RIETHMÜLLER, G., RIEBER, E.P. und RIETHMÜLLER, D.:
Untersuchungen zur Heterogenität humaner Lympho-
cyten: Trennung peripherer Lymphocyten im
Albumundichtegradienten und Untersuchung der
einzelnen Zellpopulationen auf ihre prolifera-
tive Reaktion in vitro.
Klin.Wschr. 48, 1343 - 1349 (1970).
58. RÜHL, H., KIRCHNER, H., and BOCHERT, G.:
Kinetics of the Zn^{2+} -stimulation of human
peripheral lymphocytes in vitro.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. im Druck 1971.
59. SCHELLEKENS, P.Th.A., and EIJSVOOGEL, V.P.:
Lymphocyte transformation in vitro.
I. Tissue culture conditions and quantitative
measurements.
Clin.exp.Immunol. 3, 571 - 584 (1968).
60. SCHÖPF, E., SCHULZ, K.H. und GROMM, M.:
Transformationen und Mitosen von Lymphocyten
in vitro durch Quecksilber(II)-chlorid.
Naturwissensch. 54, 568 - 569 (1967).

61. TANAKA, Y., EPSTEIN, L.B., BRECHER, G., and STOHLMAN, F., Jr.:
Transformation of lymphocytes in cultures of human peripheral blood.
Blood 22, 614 - 629 (1963).
62. THIELE, H.G.:
Untersuchungen zur Frage der Immunglobulin-Synthese durch mit Phytohämagglutinin in vitro stimulierte menschliche Lymphozyten.
I. Lichtoptische und elektronenmikroskopische Untersuchungen.
Zeitschrift Immunitätsforschung 135, 331 - 348 (1968).
63. TURK, A., GLADE, P.R., and CHESSIN, L.N.:
Blast - like transformation induced in peripheral blood lymphocytes by cellular injury: a comparison of sonication and Phytohemagglutinin.
Blood 33, 329 - 340 (1969).
64. WEBER, W.T.:
Mixed lymphocyte interaction and PHA-response of chicken spleen cells in a chemically defined medium.
Res.J.Ret.Soc. 8, 37 - 54 (1970).
65. WEGENER, W.S., and ROMANO, A.H.:
Zinc stimulation of RNA and protein synthesis in rhizopus nigricans.
Science 142, 1669 - 1670 (1963).
66. WESER, U., SEEBER, S. und WARNECKE, P.:
Zur Wirkung von Zn^{++} auf die Nukleinsäurebiosynthese von Aszites-Tumorzellen.
Experientia 25, 489 - 490 (1969).
67. WILSON, D.B.:
Analysis of some of the variables associated with the proliferative response of human lymphoid cells in culture.
J.Exp.Zool. 162, 161 - 169 (1966).
68. YOFFEY, J.M.:
The present status of the lymphocyte problem.
Lancet 1962 I, 206 - 211.

69. YOFFEY, J.M., WINTER, G.C.B., OSMOND, D.G., and
MEEK, E.S.:
Morphological studies in the culture of human
leucocytes with Phytohaemagglutinin.
Brit.J.Haemat. 11, 488 - 497 (1965).

Lebenslauf

Am 17. Juni 1935 wurde ich, Giso Autheried, als Sohn des Ingenieurs Ladislaus Autheried und seiner Ehefrau Ingeborg geb. Große in Berlin geboren.

1941 wurde ich in Berlin eingeschult. 1955 legte ich die Reifeprüfung am Internat Schulpforta bei Naumburg ab und unterzog mich 1956 der Ergänzungsprüfung zum Ostabitur in Berlin an der Freiherr-vom-Stein-Schule. Im selben Jahr begann ich mit dem Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Seit 1957 studierte ich an derselben Universität das Fach Medizin und setzte 1961 das klinische Studium an der Freien Universität Berlin fort. Ich bestand dort das Medizinische Staatsexamen im Jahre 1966. Die Medizinassistentenzeit absolvierte ich an Berliner Krankenanstalten. 1968 erhielt ich in Berlin meine Approbation als Arzt und war danach an mehreren Berliner Krankenhäusern vorwiegend auf Abteilungen der Inneren Medizin beschäftigt.

Seit dem 14. April 1970 bin ich an der Haematologischen Abteilung im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin (Leiter Prof. Dr. H. Brücher) als wissenschaftlicher Assistent tätig, wo ich Gelegenheit erhielt, die vorliegende Arbeit durchzuführen.

